Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

Der Einfluß mehrmonatiger Lagerung bei Temperaturen zwischen +4°C und -76°C auf biochemische Leistungen von Bakterien

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt
von
Veronika Amian geb. Hinze
aus
Berlin-Zehlendorf

Marburg 1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der
Universität Marburg am: 11.5.1970.

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. P. Karlson

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. W. Mannheim

Correferent: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. habil. H. Heuser

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A) Einleitung	2
B) Material und Methoden	
1. Mikroorganismen	4
2. Anzüchtung, Ernte und Lagerung	4
3. Auftauen und Vorbereitung der gelagerten Keimsuspensionen	5
4. Biochemische Prüfung	5
5. Kontrollen	6
C) Ergebnisse	
1. Die biochemischen Leistungen der gelagerten Mikroorganismen	7
a) Staphylococcus epidermidis (HIM 104-7)	7
b) Corynebacterium xerosis (HIM 109-4)	8
c) Mycobacterium phlei (HIM 32-3)	8
d) Bacillus cereus (HIM 52-6)	8
e) Achromobacter mucosus (HIM 21-1)	9
f) Aeromonas hydrophila (HIM 72-2)	9
g) Escherichia coli (HIM 16-4)	9
2. Prüfung auf Einheitlichkeit und Vermehrungsfähigkeit der Mikroorganismen	10
3. Tabellen	
a) Untersuchungen des Substratumsatzes an frisch geernteten Keimsuspensionen	11
b) Vergleichende Untersuchungen über den Substratumsatz von frisch geernteten und fünf Monate gelagerten Keimsuspensionen	12
c) Prüfung der gelagerten Keimsuspensionen auf Einheitlichkeit und Vermehrungsfähigkeit	19
E) Zusammenfassung	31
F) Literatur	33

A) Einleitung

Zur Erhaltung der Lebensfähigkeit von Mikroorganismen über einen längeren Zeitraum dienen verschiedene Methoden, wie z. B. Lyophilisation (1,24,26) oder die Lagerung von Bakteriensuspensionen unter 0°C (6,9,10,20,25,26, 27,30,37,38). Schon um 1887 beschäftigte sich PRUDDEN (28) mit der Lagerung von Bakterien auf Eis, 1901 erschien von PARK (22) eine Veröffentlichung über die Überlebensdauer auf Eis gelagerter Typhusbakterien und die Wirkung intensiver Kälte auf Bakterien, und 1918 veröffentlichten HILLIARD and DAVIS (12) ihre Untersuchungen über die Wirkung von Gefriertemperaturen auf Bakterien.

Die Fähigkeit der Mikroorganismen, Temperaturen unterhalb des Gefrierpunktes zu überleben, ist somit schon seit langem bekannt. Die verschiedensten Verfahren der Kältekonservierung wurden erprobt. Zur Beurteilung der Verfahren ermittelten die meisten Autoren jedoch lediglich die Überlebensquote der Mikroorganismen, wobei sie die Änderung enzymatischer Fähigkeiten während der Kälteeinwirkung unbeachtet ließen.

1966 untersuchte MERYMAN (20,21) die Haltbarkeit einiger mikrobieller Enzyme wie Lipasen, Proteasen, Katalasen, Peroxydasen und stellte deren Kälteresistenz fest.

Die Kältekonservierung von Mikroorganismen ist nicht nur für technische und epidemiologische, sondern auch für diagnostische und biochemische Zwecke interessant. Beim Arbeiten mit Keimsuspensionen läßt es sich aus praktischen Gründen - z. B. wegen der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeit der Mikroorganismen - oft nicht umgehen, diese bis zum Gebrauch aufzubewahren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, festzustellen, ob sich die biochemischen Eigenschaften von Keimsuspensionen nach mehrmonatiger Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen verändern.

Die Untersuchungen wurden mit sieben willkürlich ausgewählten Mikroorganismen aus den Ordnungen Eubacteriales, Actinomycetales und Pseudomonadales ausgeführt. Die biochemischen Eigenschaften dieser Mikroorganismen waren aus vorherigen Untersuchungen (29) bekannt.

B) Material und Methoden

1. Mikroorganismen

Die Untersuchungen sind mit folgenden Mikroorganismen der Stammsammlung des Hygiene-Institutes der Universität Marburg ausgeführt worden:

a) Staphylococcus epidermidis (HIM 104-7)
b) Corynebacterium xerosis (HIM 109-4)
c) Mycobacterium phlei (HIM 32-3)
d) Bacillus cereus (HIM 52-6)
e) Achromobacter mucosus (HIM 21-1)
f) Aeromonas hydrophila (HIM 72-2)
g) Escherichia coli (HIM 16-4)

2. Anzüchtung, Ernte und Lagerung

Die Anzüchtung der Mikroorganismen erfolgte mit Ausnahme von Mycobacterium phlei, das bei 25°C auf Kochblutagar angezüchtet wurde, 24 bis 48 Stunden bei 37°C auf Kochblut- bzw. Blutagar. Zur Herstellung von Massenkulturen wurden Einzelkolonien der Mikroorganismen von den Agarplatten auf mit 25ml Trypticase soy broth (Baltimore Biological Laboratory) gefüllte 100ml Erlenmeyerkolben überimpft, die mit Watte und Aluminiumfolie verschlossen wurden. Anschließend incubierten die Bakterienstämme bis zum Erreichen der spätexponentiellen Wachstumsphase, da die Keime dann auf Grund der Untersuchungen von POSTGATE and HUNTER (24), PRUDDEN (28), SEDGWICK and WINSLOW (30) die größte Kälteresistenz besitzen.

Die Ernte der Keime erfolgte durch Abzentrifugieren und zweimaliges Waschen mit physioligischer Kochsalzlösung.

Die Bakterienmasse wurde in physiologischer Kochsalzlösung oder in Glycerin-(20%)-Kochsalzlösung (0,9 %) bis zu

einer breiigen Konsistenz resuspendiert und in 15ml-Portionen aufbewahrt.

Mit Ausnahme der bei +4°C gelagerten Proben wurden alle Suspensionen zunächst bei -76°C innerhalb von etwa 10 Minuten eingefroren (20) und dann bei Temperaturen von -15°C, -22°C und -76°C fünf Monate gelagert.

3) Auftauen und Vorbereitung der gelagerten Keimsuspensionen

Alle gefrorenen Keimsuspensionen wurden vor dem Gebrauch auf die Temperatur von -15°C gebracht und dann in einem zirkulierenden Wasserbad von 37°C aufgetaut. Nach dem Auftauen der in physiologischer Kochsalzlösung gelagerten Keime erfolgte unter nephelometrischer Kontrolle die Einstellung der Suspensionsdichte mit physiologischer Kochsalzlösung auf ca. 8 mg Trockengewicht pro ml (3). Die in Glycerin-(20 %)-Kochsalzlösung-(0,9 %) gelagerten Mikroorganismen mußten zur Entfernung des Glycerins nach dem Auftauen zunächst durch zweimaliges Zentrifugieren mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen werden. Danach wurden sie in 0,9 %iger NaCl-Lösung in der oben angegebenen Weise resuspendiert.

4) Biochemische Prüfung

Nach 5-monatiger Lagerung wurden die biochemischen Leistungen der gelagerten Keimsuspensionen mit denen von frisch geernteten Bakterien verglichen. Die Untersuchung bezog sich auf folgende biochemische Leistungen:

a) die Fermentation von Zuckern und Alkoholen
b) den Abbau von Carbon- und Aminosäuren
c) die Spaltung von Glycosiden

d) die Hydrolyse von Fettsäure-, Phosphorsäure- und Schwefelsäureestern und Säureamiden
e) die Reduktion von Nitrat

Die Nachweise wurden in der von BÜRGER (3,4,5) angegebenen Weise ausgeführt. Die Versuche sind in Reagenzgläsern durchgeführt worden, da die für dieses angegebene Verfahren vorgesehene Apparatur nicht zur Verfügung stand. Die zur Untersuchung verwendeten Substrate sind in der Tab. 1 aufgeführt.

Jeder Versuchsansatz bestand aus einem Gemisch gleicher Volumina von Substratlösung und Keimsuspension. Zur Prüfung der Säurebildung aus Kohlehydraten und Alkoholen wurden die Proben vor dem Versuch mit n/100 NaOH neutralisiert, um Ungenauigkeiten in der Beurteilung des Indikatorumschlages auszuschließen.

Nach maximal sechsstündigem Stehen bei 37°C erfolgte die Ausführung der Nachweisreaktionen bzw. die Ablesung der Indikatorumschläge.

5) Kontrollen

Die Überprüfung auf Einheitlichkeit der untersuchten Mikroorganismen erfolgte nach der Ernte und nach dem Auftauen durch Anzüchtung auf Kochblut- bzw. Blutagar sowie im mikroskopischen Präparat.

Zur Sicherung der Ergebnisse sind alle Versuche doppelt ausgeführt, die Substrate durch Leerwerte und mit abgetöteter Keimsuspension versetzt, überprüft worden.

C) Ergebnisse

1. Die biochemischen Leistungen der gelagerten Mikroorganismen

Alle Keime waren nach der Lagerung noch vermehrungsfähig. Die in physiologischer Kochsalzlösung und in Glycerin-(20 %)-Kochsalzlösung-(0,9 %) aufbewahrten Keime verhielten sich wenig unterschiedlich in ihren biochemischen Leistungen.

Die Prüfung der biochemischen Leistungen der Bakterienstämme ergab folgendes:

a) Staphylococcus epidermidis

Die bei +4°C und auch bei -15°C gelagerten Keime zeigten gegenüber den frisch geernteten Mikroorganismen geringfügige Unterschiede. Kaliumnitrat reduzierten nur noch die in Glycerin-(20 %)-Kochsalzlösung-(0,9 %) bei +4°C gelagerten Keime, ebenso konnten diese Keime nur noch aus Natriumformiat Säure bilden. Bei unter diesen Bedingungen gelagerte Keimsuspensionen und bei den bei +4°C in physiologischer Kochsalzlösung gelagerten Keimsuspensionen war die Fähigkeit zur Hydrolyse von Indoxylbutyrat und Indoxylacetat abgeschwächt. Außerdem war bei den bei +4°C und bei -15°C gelagerten Bakteriensuspensionen ohne Glycerinzusatz das Vermögen α -Naphtylphosphat und bei den bei +4°C gelagerten Mikroorganismen Phenolphthalein zu hydrolysieren, vermindert. Alle bei +4°C gelagerten Keimsuspensionen konnten die Zucker nicht mehr abbauen. Wie die Tab. 2 zeigt, sind bei den in tieferen Temperaturen gelagerten Keimsuspensionen keine Abweichungen der biochemischen Verhaltensweise

gegenüber den frisch geernteten festzustellen.

b) Corynebacterium xerosis

Die bei +4°C gelagerten Keime konnten Zucker nicht mehr spalten. Bei -15°C und tieferen Temperaturen gelagerte Keime (Tab. 3) zeigten gleiche Reaktionen wie frisch geerntete Mikroorganismen. p-Nitrophenyllaurat und p-Nitrophenylmyristat konnten von den Bakteriensuspensionen sämtlicher Temperaturbereiche nur noch in geringem Maße abgebaut werden.

c) Mycobacterium phlei

Aus Tab. 4 geht hervor, daß bei Mycobacterium phlei keine von der Lagerungstemperatur abhängigen Unterschiede im Testergebnis zu finden sind. Hierbei ist zu bemerken, daß nur Stoffwechselleistungen geprüft wurden, die keine koordinierte Leistung verschiedener Enzymsysteme, wie z. B. die Prüfung des Zuckerabbaus bei den übrigen Mikroorganismen darstellt, erfordern.

d) Bacillus cereus

L-Ornithin und p-Arbutin wurden nur von den in -76°C eingefrorenen Keimen noch gespalten. Die bei +4°C und -15°C gelagerten Keime mit dem Glycerinzusatz zeigten einen verminderten Abbau der Zucker. Kaliumnitrat wird von den bei +4°C mit Glycerinzusatz gelagerten Keimen in geringerem Maße reduziert als von den in physiologischer Kochsalzlösung gelagerten, und Natriumformiat wird von allen bei +4°C gelagerten Mikroorganismen nicht alkalisiert. Das Untersuchungsergebnis ist in Tab. 5 dargestellt.

e) Achromobacter mucosus

Die bei -76°C gelagerten Mikroorganismen zeigten in ihren biochemischen Leistungen das gleiche Verhalten wie frisch geernteten Keime. Die auch bei frischen Bakterien geringe Fähigkeit zur Spaltung von p-Nitrophenylmyristat ließ sich nur bei den bei -76°C eingefrorenen Keimen nachweisen. Im übrigen ist, wie aus Tab. 6 hervorgeht, bei einer Lagerungstemperatur von +4°C die Säurebildung aus Zucker sowie der Abbau von Natriumcitrat und Natriummalonat stark reduziert, außerdem sind diese Keime nicht mehr in der Lage, eine Alkalisierung von Natriumformiat zu bewirken.

f) Aeromonas hydrophila

Tab. 7 zeigt, daß vor allem das Vermögen, die Ester höherer Fettsäuren wie p-Nitrophenyllaurat und p-Nitrophenylmyristat zu hydrolysieren, durch die Lagerung dieser Mikroorganismen reduziert wird. Weiterhin fällt auf, daß das Glycosid p-Arbutin sowie die Aminosäure L-Arginin in gleichem Maße wie durch frische Keime abgebaut werden können, wenn die Lagerungstemperatur -76°C beträgt.

g) Escherichia coli

Die bei verschiedenen Temperaturen gelagerten Mikroorganismen stimmen in ihren biochemischen Leistungen mit den frisch geernteten Keimen überein (Tab. 8). Glycerin und Mannit werden von den bei +4°C gelagerten Keimsuspensionen vermindert gespalten, Natriumformiat geringer von den in Glycerin-(20 %)-Kochsalzlösung-(0,9 %) bei +4°C und -15°C eingefrorenen Bakterien alkalisiert als von den in physiologischer Kochsalzlösung gelagerten.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Lagerung von Mikroorganismen bei höherer Temperatur als -22°C vor allem das Vermögen zum Abbau der Kohlehydrate reduziert.

2. Prüfung auf Einheitlichkeit und Vermehrungsfähigkeit der Mikroorganismen

Die Ergebnisse der Prüfung auf Einheitlichkeit und Vermehrungsfähigkeit der Mikroorganismen sind den Tabellen 9 bis 15 zu entnehmen.

Tabelle 1

Untersuchungen des Substratumsatzes an frisch geernteten Keimsuspensionen:

Substrat	Staph.epiderm. (HIM 104-7)	Coryneb. xerosis (HIM 109-4)	Mycob.phlei (HIM 32-3)	Bacillus cereus (HIM 52-6)	Achromob. mucosus (HIM 21-1)	Aeromonas hydrophila (HIM 72-2)	Escherichia coli (HIM 16-4)
L(+)-Arabinose	-	-	-	-	+	+	+
D-Ribose	-	+		-	+	+	-
D(+)-Xylose	-	-	-	-	+	-	+
D(-)-Fructose	+	+	-	-	-	+	+
D(+)-Galaktose	-	+	-	+	+	+	+
D(+)-Glucose	+	+	-	+	+	+	+
D-Mannose	-	+	-	+	+	+	+
L(+)-Rhamnose		-	-	-		-	+
D(+)-Lactose	-	-	-	-	+	-	+
Maltose	-	+	-	+	-	+	+
D(+)-Saccharose	+	-	-	-	-	+	+
d(+)-Trehalose	+		-	+	-	+	+
Raffinose	-	-	-	-		-	+
Glycerin	-	-	-	-	-	-	+
D(-)-Mannit	-	-	-	-	-	+	+
Natriumformiat (Säurebildung)	+		+	+	+	-	+
Natriumcitrat	-	-	+	-	+	-	+
Natriummalonat	-	-	+	-	+	-	-
L-Arginin	+	-	-	-	-	+	+
L-Lysin	-	-	-	-	-	-	+
L-Ornithin	-	-	+	+	-	-	+
L-Phenylalanin	-	-	-	-	-	-	+
L(+)-Cystein	-	-	+	+	+	-	-
p-Arbutin	-	-	-	(+)	-	+	-
p-Nitrophenyl-ß-D-galaktopyranosid	-	-	-	-	-	+	+
6-Brom-2-nyphthyl-ß-D-galaktopyranosid	-	-	-	-	-	-	+

Substrat	Staph.epiderm. (HIM 104-7)	Coryneb. xerosis (HIM 109-4)	Mycob.phlei (HIM 32-3)	Bacillus cereus (HIM 52-6)	Achromob. mucosus (HIM 21-1)	Aeromonas hydrophila (HIM 72-2)	Escherichia coli (HIM 16-4)
Indoxyl-ß-D-glucosid	-	-	-	-	-	-	+
Phenolphthalein-glucuronid	+	-	-	-	-	-	+
Harnstoff	-	-	+	+	+	-	-
Kaliumnitrat	+	-	+	+	-	+	+
Indoxylacetat	+	-	+	-	+	-	-
Indoxylbutyrat	+	-	+	-	+	-	-
Caprylsäure-ß-naphthylester	+	+	+	+	+	+	+
p-Nitrophenyllaurat	+	+	+	+	+	+	-
Di-Natrium-pheny.-phosphat pH 9,3	-	+	-	+	(+)	+	+
p-Nitrophenylmyristat	-	+	+	-	(+)	+	-
∝-Naphthylphosphat pH 8,3	-	+	-	+	+	+	+
Di-Natriumphenolphthaleindiphosphat pH 9,7	-	+	-	+	-	+	-
Di-Natriumphenolphthaleindiphosphat pH 5,4	+	+	-	+	+	+	+
p-Nitrophenylphosphat pH 10,5	-	+	+	+	+	+	+
∝-Naphthylphosphat pH 5,2	+	+	+	+	+	+	+
p-Nitrophenylphosphat pH 4,8	+	+	-	+	+	+	+
L-Leucin-ß-naphthylamid	-	+	+	+	+	+	+
D-L-Alanin-ß-naphthylamid pH 6,5	-	+	+	-	+	+	+

Erläuterung zu Tab. 1

+ = positive Reaktion, d.h. nachweisbarer Substratumsatz

(+) = schwach positive Reaktion, d.h. gering nachweisbarer Substratumsatz

- = keine Reaktion, d.h. kein nachweisbarer Substratumsatz

Tabelle 2

Vergleichende Untersuchungen über den Substratumsatz von frischen und fünf Monate gelagerten Keimsuspensionen von Staphylococcus epidermidis (HIM 104-7)

Substrat	frisch	+4°C ohne Glycerinzus.	+4°C mit Glycerinzus.	-15°C ohne Glycerinzus.	-15°C mit Glycerinzus.	-22°C ohne Glycerinzus.	-22°C mit Glycerinzus.	-76°C ohne Glycerinzus.	-76°C mit Glycerinzus.
D(-)-Fructose	+	-	-	+	+	+	+	+	+
D(-)-Glucose	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	-	-	+	+	+	+	+	+
D(+)-Saccharose	+	-	-	+	+	+	+	+	+
d(+)-Trehalose	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Natriumformiat (Säurebildung)	+	-	(+)	+	+	+	+	+	+
L-Arginin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phenolphthalein-glucuronid	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+
Kaliumnitrat	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Indoxylacetat	+	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+
Indoxylbutyrat	+	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+
Caprylsäure-ß-naphthylester	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p-Nitrophenyllaurat	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Naphthylphosphat pH 5,2	+	(+)	+	(+)	+	+	+	+	+
p-Nitrophenylphosphat pH 4,2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
di-Natriumphenolphthaleindiphosphat pH 5,4	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Erläuterung zu Tab. 2

\+ = nachweisbarer Substratumsatz
(+) = gering nachweisbarer Substratumsatz
\- = kein nachweisbarer Substratumsatz

Tabelle 3

Vergleichende Untersuchungen über den Substratumsatz von frischen und fünf Monate gelagerten Keimsuspensionen von Corynebacterium xerosis (HIM 109-4)

		+4°C		-15°C		-22°C		-76°C	
Substrat	frisch	ohne Glycerinzus.	mit Glycerinzus.	ohne Glycerinzus.	mit Glycerinzus.	ohne Glycerinzus.	mit Glycerinzus.	ohne Glycerinz.	mit Glycerinz.
D-Ribose	+	-	-	+	+	+	+	+	+
D(-)-Fructose	+	-	-	+	+	+	+	+	+
D(+)-Galactose	+	-	-	+	+	+	+	+	+
D(-)-Glucose	+	-	-	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	-	-	+	+	+	+	+	+
D(+)-Saccharose	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Caprylsäure-ß-naphthylester	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p-Nitrophenyllaurat	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
p-Nitrophenylmyristat	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
di-Natrium-phenyl-phosphat pH 9,3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Naphthylphosphat pH 8,3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
di-Natrium-phenolph-thaleindiphosphat pH 9,7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
di-Natrium-phenolph-thaleindiphosphat pH 5,4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p-Nitrophenylphosphat pH 10,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Naphthylphosphat pH 5,2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p-Nitrophenylphosphat pH 4,8	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Leucin-ß-naph-thylamid	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-L-Alanin-ß-naphthylamid pH 6,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Erläuterung zu Tab. 3

\+ = nachweisbarer Substratumsatz
(+) = gering nachweisbarer Substratumsatz
\- = kein nachweisbarer Substratumsatz

Tabelle 4

Vergleichende Untersuchungen über den Substratumsatz von frischen und fünf Monate gelagerten Keimsuspensionen von Mycobacterium phlei (HIM 32-3)

		+4°C		-15°C		-22°C		-76°C	
Substrat	frisch	ohne Glycerinzus.	mit Glycerinzus.	ohne Glycerinzus.	mit Glycerinzus.	ohne Glycerinzus.	mit Glycerinzus.	ohne Glycerinzus.	mit Glycerinzus.
Natriumformiat	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Natriumcitrat	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Natriummalonat	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Ornithin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L(+)-Cystein	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Harnstoff	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kaliumnitrat	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indoxylacetat	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indoxylbutyrat	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Caprylsäure-ß-naphthylester	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p-Nitrophenyl-laurat	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p-Nitrophenyl-myristat	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p-Nitrophenylphosphat pH 10,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Naphthylphosphat pH 5,2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Leucin-ß-naphthylamid	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-L-Alanin-ß-naphthylamid pH 6,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Erläuterung zu Tab. 4

\+ = nachweisbarer Substratumsatz

Tabelle 5

Vergleichende Untersuchungen über den Substratumsatz von frischen und fünf Monate gelagerten Keimsuspensionen von Bacillus cereus (HIM 52-6)

		+4°C		-15°C		-22°C		-76°C	
Substrat	frisch	ohne Glycerinzus.	mit	ohne Glycerinzus.	mit	ohne Glycerinzus.	mit	ohne Glycerinzus.	mit
D(+)-Galactose	+	+	(+)	+	(+)	+	+	+	+
D(-)-Glucose	+	+	(+)	+	(+)	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	(+)	+	(+)	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
d(+)-Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Natriumformiat (Säurebildung)	+	-	-	+	+	+	+	+	+
L-Ornithin	+	-	-	-	-	-	-	+	+
L(+)-Cystein	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p-Arbutin	+	-	-	-	-	-	-	+	+
Harnstoff	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kaliumnitrat	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+
Caprylsäure-ß-naphthylester	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p-Nitrophenyllaurat	+	+	+	+	+	+	+	+	+
di-Natriumphenyl-phosphat pH 9,3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Naphthylphosphat pH 8,3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
di-Natriumphenolph-thaleindiphosphat pH 9,7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
di-Natriumphenolph-thaleindiphosphat pH 5,4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p-Nitrophenylphos-phat pH 10,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Naphthylphosphat pH 5,2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p-Nitrophenylphos-phat pH 4,8	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Leucin-ß-naphtylamid	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Erläuterung zu Tab. 5
+ = nachweisbarer Substratumsatz
(+) = gering nachweisbarer Substratumsatz
- = kein nachweisbarer Substratumsatz

Tabelle 6

Vergleichende Untersuchungen über den Substratumsatz von frischen und fünf Monate gelagerten Keimsuspensionen von Achromobacter mucosus (HIM 21-1)

		+4°C		-15°C		-22°C		-76°C	
Substrat	frisch	ohne Glycerinzus.	mit Glycerinzus.	ohne Glycerinzus.	mit Glycerinzus.	ohne Glycerinzus.	mit Glycerinzus.	ohne Glycerinzus.	mit Glycerinzus.
L(+)-Arabinose	+	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+
D-Ribose	+	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+
D(+)-Xylose	+	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+
D(+)-Galactose	+	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+
D(-)-Glucose	+	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+
D(+)-Lactose	+	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+
Natriumformiat	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Natriumcitrat	+	(+)	-	+	+	+	+	+	+
Natriummalonat	+	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+
L(+)-Cystein	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Harnstoff	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indoxylacetat	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indoxylbutyrat	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Caprylsäure-ß-naphthylester	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p-Nitrophenyllaurat	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
p-Nitrophenyl-myristat	(+)	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)
di-Natrium-phenyl-phosphat pH 9,3	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
α-Naphthylphosphat pH 8,3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
di-Na-phenolph-thaleindiphosphat pH 9,7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
di-Na-phenolph-thaleindiphosphat pH 5,4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p-Nitrophenylphos-phat pH 10,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Naphthylphosphat pH 5,2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p-Nitrophenylphos-phat pH 4,8	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Leucin-ß-naph-thylamid	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-L-Alanin-ß-naphthylamid	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Erläuterung zu Tab. 6

\+ = nachweisbarer Substratumsatz
(+) = gering nachweisbarer Substratumsatz
\- = kein nachweisbarer Substratumsatz

Tabelle 7

Vergleichende Untersuchungen über den Substratumsatz von frischen und fünf Monate gelagerten Keimsuspensionen von Aeromonas hydrophila (HIM 72-2)

Substrat	frisch	+4°C ohne Glycerinzus.	+4°C mit Glycerinzus.	-15°C ohne Glycerinzus.	-15°C mit Glycerinzus.	-22°C ohne Glycerinzus.	-22°C mit Glycerinzus.	-76°C ohne Glycerinzus.	-76°C mit Glycerinzus.
L(+)-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D(-)-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D(+)-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D(-)-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D(+)-Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
d(+)-Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D(-)-Mannit	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arginin	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+
p-Arbutin	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+
p-Nitrophenyl-ß-D-galactopyranosid	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6-Br-2-naphthyl-ß-D-galactopyranosid	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indoxyl-ß-D-glucosid	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kaliumnitrat	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Caprylsäure-ß-naphthylester	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p-Nitrophenyl-laurat	+	-	-	-	-	-	-	-	-
p-Nitrophenyl-myristat	+	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)
di-Natriumphenyl-phosphat pH 9,3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Naphthylphosphat pH8,3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
di-Natriumphenolph-thaleindiphosphat pH 9.7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
di-Natriumphenolph-thaleindiphosphat pH 5,4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p-Nitrophenyl-phosphat pH 10,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Naphthylphos-phat pH 4,8	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Leucin-ß-naph-thylamid	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-L-Alanin-ß-naphthylamid pH 6,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Erläuterung zu Tab. 7

\+ = nachweisbarer Substratumsatz
(+) = gering nachweisbarer Substratumsatz
\- = kein nachweisbarer Substratumsatz

Tabelle 8

Vergleichende Untersuchungen über den Substratumsatz von frischen und fünf Monate gelagerten Keimsuspensionen von Escherichia coli (HIM 16-4)

		+4°C		-15°C		-22°C		-76°C	
Substrat	frisch	ohne Glycerinzus.	mit Glycerinzus.	ohne Glycerinzus.	mit Glycerinzus.	ohne Glycerinzus.	mit Glycerinzus.	ohne Glycerinzus.	mit Glycerinzus.
L(+)-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D(+)-Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D(-)-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D(+)-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D(-)-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L(+)-Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D(+)-Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D(-)-Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
d(+)-Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerin	+	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+
D(-)-Mannit	+	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+
Natriumformiat (Säurebildung)	+	+	(+)	+	(+)	+	+	+	+
Natriumcitrat	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arginin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Lysin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Ornithin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Phenylalanin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p-Nitrophenyl-ß-D-galactopyranosid	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6-Br-2-naphthyl-ß-D-galactopyranosid	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indoxyl-ß-D-glucosid	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phenolphthalein-glucuronid	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kaliumnitrat	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Caprylsäure-ß-naphthylester	+	+	+	+	+	+	+	+	+
di-Natriumphenyl-phosphat	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Naphthylphosphat pH 8,3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
di-Natriumphenolphthaleindiphosphat pH 5,4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p-Nitrophenyl-phosphat pH 10,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Naphthylphosphat pH 5,2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p-Nitrophenylphosphat pH 4,8	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Leucin-ß-naphthylamid	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-L-Alanin-ß-naphthylamid pH 6,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Erläuterung zu Tab. 8

\+ = nachweisbarer Substratumsatz
(+) = gering nachweisbarer Substratumsatz
\- = kein nachweisbarer Substratumsatz

Tabelle 9

Prüfung der gelagerten Keimsuspension von Staphylococcus epidermidis (HIM 104-7) auf Einheitlichkeit und Vermehrungsfähigkeit

Lager.-temp.	Mikroskopisches Präparat		Prüfung auf Einheitlichkeit und Vermehrungsfähigkeit durch Ausstrich auf Blutagarplatten			
	Färbung nach Gram		Kolonienbild		Wachstum	
	ohne Glycerinzusatz	mit Glycerinzusatz	ohne Glycerinzusatz	mit Glycerinzusatz	ohne Glycerinzusatz	mit Glycerinzusatz
+4°C	gram-+ und gram--Kokken vereinzelt	gram-+ Kokken	einheitlich	einheitlich	sehr spärlich	spärlich
-15°C	gram-+ und gram-- Kokken	gram-+ Kokken vereinzelt gram-- Kokken	einheitlich	einheitlich	reichlich	reichlich
-22°C	gram-+ Kokken	gram-+ und gram-- Kokken vereinzelt	einheitlich	einheitlich	reichlich	reichlich
-76°C	gram-+ und gram-- Kokken	gram-+ und gram-- Kokken	einheitlich	einheitlich	reichlich	reichlich

Tabelle 10

Prüfung der gelagerten Keimsuspension von Corynebacterium xerosis (HIM 109-4) auf Einheitlichkeit und Vermehrungsfähigkeit

Lager.-temp.	Mikroskopisches Präparat, Färbung nach Gram: ohne Glycerinzusatz	Mikroskopisches Präparat, Färbung nach Gram: mit Glycerinzusatz	Prüfung auf Einheitlichkeit und Vermehrungsfähigkeit durch Ausstrich auf Blutagarplatten: Kolonienbild ohne Glycerinzusatz	Kolonienbild mit Glycerinzusatz	Wachstum ohne Glycerinzusatz	Wachstum mit Glycerinzusatz
+4°C	gram-+ und gram--Stäbchen Zerfallsprodukte	gram-+ und gram--Stäbchen Zerfallsprodukte	einheitlich	einheitlich	sehr spärlich	spärlich
-15°C	gram-+ Stäbchen	gram-+ und gram--Stäbchen vereinzelt	einheitlich	einheitlich	reichlich	reichlich
-22°C	gram-+ und gram--Stäbchen vereinzelt	gram-+ und gram--Stäbchen vereinzelt	einheitlich	einheitlich	reichlich	reichlich
-76°C	gram-+ und gram--Stäbchen	gram-+ und gram--Stäbchen vereinzelt	einheitlich	einheitlich	reichlich	reichlich

Tabelle 11

Prüfung der gelagerten Keimsuspension von Mycobacterium phlei (HIM 32-3) auf Einheitlichkeit und Vermehrungsfähigkeit

Lag.-temp.	Mikroskopisches Präparat		Prüfung auf Einheitlichkeit und Vermehrungsfähigkeit durch Ausstrich auf Blutagarplatten			
	Färbung nach Ziehl-Neelsen		Kolonienbild		Wachstum	
	ohne Glycerinzusatz	mit Glycerinzusatz	ohne Glycerinzusatz	mit Glycerinzusatz	ohne Glycerinzusatz	mit Glycerinzusatz
+4°C	rote Stäbchen und Zerfallsprodukte	rote Stäbchen und Zerfallsprodukte	einheitlich	einheitlich	spärlich	spärlich
-15°C	rote Stäbchen	rote Stäbchen	einheitlich	einheitlich	reichlich	reichlich
-22°C	rote Stäbchen	rote Stäbchen	einheitlich	einheitlich	reichlich	reichlich
-76°C	rote Stäbchen	rote Stäbchen	einheitlich	einheitlich	reichlich	reichlich

Tabelle 12

Prüfung der gelagerten Keimsuspension von Bacillus cereus (HIM 52-6) auf Einheitlichkeit und Vermehrungsfähigkeit

Lager.-temp.	Mikroskopisches Präparat		Prüfung auf Einheitlichkeit und Vermehrungsfähigkeit durch Ausstrich auf Blutagarplatten			
	Färbung nach Gram		Kolonienbild		Wachstum	
	ohne Glycerinzusatz	mit Glycerinzusatz	ohne Glycerinzusatz	mit Glycerinzusatz	ohne Glycerinzusatz	mit Glycerinzusatz
+4°C	gram-+ und gram--Stäbchen Zerfallsprodukte	gram-+ und gram--Stäbchen Zerfallsprodukte in großer Menge	einheitlich	einheitlich	spärlich	spärlich
-15°C	gram-+ und gram--Stäbchen vereinzelt	gram-+ und gram--Stäbchen vereinzelt	einheitlich	einheitlich	reichlich	reichlich
-22°C	gram-+Stäbchen	gram-+Stäbchen	einheitlich	einheitlich	reichlich	reichlich
-76°C	gram-+Stäbchen	gram-+Stäbchen	einheitlich	einheitlich	reichlich	reichlich

Tabelle 13

Prüfung der gelagerten Keimsuspension von Achromobacter mocosus (HIM 21-1) auf Einheitlichkeit und Vermehrungsfähigkeit

Lager.-temp.	Mikroskopisches Präparat		Prüfung auf Einheitlichkeit und Vermehrungsfähigkeit durch Ausstrich auf Blutagarplatten			
	Färbung nach Gram		Kolonienbild		Wachstum	
	ohne Glycerinzusatz	mit Glycerinzusatz	ohne Glycerinzusatz	mit Glycerinzusatz	ohne Glycerinzusatz	mit Glycerinzusatz
+4°C	gram--Stäbchen Zerfallsprodukte	gram--Stäbchen Zerfallsprodukte	einheitlich	einheitlich	reichlich	reichlich
-15°C	gram--Stäbchen Zerfallsprodukte	gram--Stäbchen Zerfallsprodukte	einheitlich	einheitlich	reichlich	reichlich
-22°C	gram--Stäbchen	gram--Stäbchen	einheitlich	einheitlich	reichlich	reichlich
-76°C	gram--Stäbchen	gram--Stäbchen	einheitlich	einheitlich	reichlich	reich lich

Tabelle 14

Prüfung der gelagerten Keimsuspension von Aeromonas hydrophila (HIM 72-2) auf Einheitlichkeit und Vermehrungsfähigkeit

Lager.-temp.	Mikroskopisches Präparat		Prüfung auf Einheitlichkeit und Vermehrungsfähigkeit durch Ausstrich auf Blutagarplatten			
	Färbung nach Gram		Kolonienbild		Wachstum	
	ohne Glycerinzusatz	mit Glycerinzusatz	ohne Glycerinzusatz	mit Glycerinzusatz	ohne Glycerinzusatz	mit Glycerinzusatz
+4°C	gram-+ und gram--Stäbchen Zerfallsprodukte	gram-Stäbchen Zerfallsprodukte	einheitlich	einheitlich	spärlich	spärlich
-15°C	gram--Stäbchen	gram-+ und gram--Stäbchen	einheitlich	einheitlich	reichlich	reichlich
-22°C	gram--Stäbchen	gram--Stäbchen	einheitlich	einheitlich	reichlich	reichlich
-76°C	gram--Stäbchen	gram--Stäbchen	einheitlich	einheitlich	reichlich	reichlich

Tabelle 15

Prüfung der gelagerten Keimsuspension von Escherichia coli (HIM 16-4) auf Einheitlichkeit und Vermehrungsfähigkeit

Lager.-temp.	Mikroskopisches Präparat, Färbung nach Gram		Prüfung auf Einheitlichkeit und Vermehrungsfähigkeit durch Ausstrich auf Blutagarplatten			
			Kolonienbild		Wachstum	
	ohne Glycerinzusatz	mit Glycerinzusatz	ohne Glycerinzusatz	mit Glycerinzusatz	ohne Glycerinzusatz	mit Glycerinzusatz
+4°C	gram--Stäbchen gram-+Stäbchen vereinzelt Zerfallsprodukte	gram--Stäbchen gram-+Stäbchen vereinzelt	einheitlich	einheitlich	reichlich	reichlich
-15°C	gram--Stäbchen gram-+Stäbchen vereinzelt	gram--Stäbchen	einheitlich	einheitlich	reichlich	reichlich
-22°C	gram--Stäbchen gram-+Stäbchen vereinzelt	gram--Stäbchen gram-+ Stäbchen vereinzelt	einheitlich	einheitlich	reichlich	reichlich
-76°C	gram--Stäbchen	gram--Stäbchen gram-+Stäbchen vereinzelt	einheitlich	einheit lich	reichlich	reichlich

D) Diskussion

PRUDDEN (28) erkannte schon 1887, daß "supercooling" eine weitaus geringer zerstörende Wirkung auf Mikroorganismen hat als einfaches Gefrieren und beschreibt, daß die Überlebensquote in tieferen Temperaturen weitaus höher liegt als in niedrigeren. Er spricht von einem stufenweisen Tod der Bakterien bei der Lagerung. Außerdem bemerkt er, daß Bakterien in ihrem Wachstum ein bestimmtes Stadium nicht überschritten haben dürfen, wenn sie gelagert werden sollen.

Aus der angegebenen Literatur ist zu entnehmen, daß verschiedene Bedingungen zur Lagerung von Bakterien erfüllt werden müssen, wenn die Überlebenschance in Temperaturen unter 0°C bestehen soll. Das Überleben von eingefrorenen Bakterien ist abhängig:

a) von der Geschwindigkeit des Einfrierens und des Auftauens (Ref. 2,6,13,17,19,25,36),

b) von osmotischen Druck des Suspensionsmediums und von verschiedenen Zusätzen (Ref. 7,8,12,13,14,15,16,19,23, 25,26,32,36,39),

c) von der Zelldichte der Keimsuspension (Ref. 17,18,19),

d) von der Wachstumsphase, aus der die Keime zwecks Lagerung geerntet werden (Ref. 6,11,23,24,26,27,28,33,35),

e) von der Art der zu lagernden Keime (Ref. 17,19,21,22, 31,34).

Für die schädliche Wirkung des Gefrierens sind verschiedene Faktoren verantwortlich. Einen Faktor stellt die mechanische Einwirkung interzellulären Eises dar (12,14,39). Längeres

Einfrieren soll zur Ausbildung eines "intercristallic film" (39) führen, der die Zellen vor einer mechanischen Zerstörung schützen kann, so lange das vollständige Gefrieren der interzellulären Flüssigkeit verhindert wird. Langsames Einfrieren bewirkt Dehydration der Zellen (19) und damit die Änderung des osmotischen Druckes. Diese Veränderung infolge des Wasserverlustes beim Gefriervorgang untersuchte MAZUR (19). Schnelles Einfrieren begünstigt die Ausbildung kleiner instabiler Eiskristalle, die beim langsamen Erwärmen rekristallisieren, ein Prozess, der als "migratory recristalization" oder "graingrowth" bezeichnet wird. Extrem schnelles Einfrieren schließlich führt zur Bildung eines Mantels, der beim Gefrieren des Inhaltes infolge der unterschiedlichen Ausdehnungskoeffizienten von Wasser und Eis zerreißt.

Beim Auftauen intrazellulären Eises ist zu beachten, daß langsames Erwärmen Rekristallisationsvorgänge begünstigt, schnelles Auftauen dagegen die Zellstrukturen durch Zerreißen schädigt, wie es am Auftreten autolytischer Vorgänge nachgewiesen worden ist (8,25).

Verschiedene Autoren versuchen durch Zusätze anorganischer Salze oder nieder- bzw. höhermolekularer organischer Stoffe, die zellschädigende Wirkung des Gefrierens und Auftauens zu verhindern (12,14,19,31,36,39). Die Suche nach schützenden Zusätzen ließ sich dadurch begründen, daß in Wasser suspendierte Bakterien beim Gefrieren und Auftauen die höchste Mortalität zeigten (14).

Die Schutzwirkung der unterschiedlichen Zusätze ließ sich nicht einheitlich beurteilen, da verschiedene Mikroorganismen in den einzelnen Wachstumsphasen unterschiedlich reagieren (23,24,26,28,33,39).

Über eine günstige Wirkung von 10 bis 20 %igen Glycerinzusätzen wurde wiederholt berichtet (13,19,25), weshalb in den hier beschriebenen Versuchen vergleichend zu der Kochsalzsuspension Keime in 20 %iger Glycerin-Kochsalz (0,9 %)-lösung verwendet wurden. Nach KEITH (14) soll die Schutzwirkung auf einer besseren Ausbildung des "intercristallic film" beruhen. HOWARD (13) hielt folgende in 15 %iger Glycerinlösung suspendierte bei -10°C gelagerte Keime über 5 Monate lebensfähig: Aerobacter aerogenes, Corynebacterium diphtheriae, Corynebacterium xerosis, Corynebacterium pseudodiphterium, Diplococcus pneumoniae, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeroginosa, Salmonella enteritidis, Serratia marcescens, Shigella flexneri, Streptococcus viridans.

Unter gleichen Bedingungen konnte Haemophilus influenzae 4 Monate gelagert werden, Neisseria meningitis 6 Wochen, Neisseria gonorhoeae 3 Wochen.

Ein weiterer, schwer zu beurteilender Faktor ist der Einfluß der Zelldichte auf die Überlebensquote. Die Überlebensdauer steigt im allgemeinen mit der Dichte der Suspension der Keime (7,11). Da darüber hinaus unterschiedliche Mikroorganismen sich ganz verschieden verhalten können, ist es schwierig, allgemein verbindliche Angaben für die Lagerung von Mikroorganismen zu machen, die über die Empfehlung hinausgehen, Einfrieren und Auftauen schnell durchzuführen und dichte Keimsuspensionen zu verwenden.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden diese günstigen Lagerungsbedingungen beachtet, da zu erwarten war, daß die enzymatischen Leistungen am besten in vermehrungsfähigen Zellen erhalten bleiben. Wie aus den Ergebnissen (Tab. 2 bis 8) hervorgeht, ist eine konservierende Wirkung durch

Glycerinzusatz nicht generell nachweisbar. Unterhalb von -15°C Lagerungstemperatur sind überhaupt keine Unterschiede gegenüber der Natriumchloridlösung als Suspensionsmittel zu finden, und bei + 4°C und bei -15°C wirkt sich der Glycerinzusatz bei Staphylococcus epidermidis (Tab. 2) positiv und bei Bacillus cereus (Tab. 5) und Escherichia coli (Tab. 8) gering negativ aus. Diese geringen Unterschiede sind praktisch unbedeutend, da eine Temperatur von +4°C ohnehin nicht in Frage kommt. Die Temperatur von +4°C als Lagerungstemperatur wurde nur gewählt, um das Verhalten der Bakterien unter vergleichsweise extrem ungünstigen Bedingungen zu studieren.

Der Glycerinzusatz scheint nach diesen Ergebnissen überflüssig. Es ist dennoch nicht auszuschließen, daß die Vermehrungsfähigkeit der Keime bei der Lagerung durch den Glycerinzusatz länger erhalten bleibt. Die Unterschiede sind so gering, daß sie sich im qualitativen biochemischen Test nicht erkennen lassen. Eine Lagerung der Suspension bei einer Temperatur von +4°C läßt sich als eine künstliche Alterung der Zellen auffassen. Entscheidend für die Konservierung mit Mikroorganismen ist die Unterdrückung der einzelnen enzymatischen Reaktionen und nicht die Unterdrückung der Vermehrungsfähigkeit. Die bei der Temperatur von +4°C festgestellte Schädigung biochemischer Leistungsfähigkeit betrifft vorwiegend, aber nicht ausschließlich, solche Leistungen, die ein koordiniertes Funktionieren mehrerer Enzymsysteme erfordern. Bacillus cereus stellt eine Ausnahme dar insofern, als nur die Fähigkeit zur Hydrolyse des Glycosids Arbutin und der Aminosäure Ornithin und z.T. der Natriumformiatabbau verloren gegangen ist.

Die Bedeutung einiger enzymatischer Ausfälle (vergl. Tab. 2 bis 8) für die betreffenden Mikroorganismen kann nicht

erklärt werden, so lange nicht der gesamte Stoffwechsel übersehen wird. Die Untersuchungen mehrerer Stämme gleicher Species könnte die Frage entscheiden, ob die beobachteten Ausfälle für die betreffende Species spezifisch ist.

Bei mehrmonatiger Lagerung unterhalb von -22°C ist bei der Prüfung biochemischer Eigenschaften von Mikroorganismen nicht mit einer qualitativ nachweisbaren Herabsetzung der Leistungsfähigkeit zu rechnen. Allerdings fehlen solche Untersuchungen für empfindlichere Keime, die bereits nach wenigen Wochen Lagerung bei Temperaturen unter 0°C nicht mehr vermehrungsfähig sind. Das Vorliegen intakter Zellen ist zur Prüfung enzymatischer Einzelleistungen nicht erforderlich, wie sich an der Untersuchung von Zellhomogenisaten beweisen läßt. Hier bleiben intakte und vermehrungsfähige Zellen mit Sicherheit im biochemischen Test unverändert reaktionsfähig.

Bei der Lagerung dichter Keimsuspensionen in tiefen Temperaturen traten mit qualitativen Methoden nachweisbare Schädigungen der hydrolytisch wirksamen Enzyme, z.B. durch autolytische Vorgänge, nicht auf. Dieser Befund ist insofern von Bedeutung, als sich daraus ergibt, daß Untersuchungen von Mikroorganismen, z.B. für taxonomische oder diagnostische Zwecke nicht mit frischen Keimsuspensionen durchgeführt werden müssen. Wenn Keimsuspensionen bei Temperaturen oberhalb von -22°C gelagert werden, ist dagegen mit unvorhersehbaren Ausfällen enzymatischer Leistungen zu rechnen.

E) Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die biochemischen Leistungen von sieben ausgewählten Stämmen an den Ordnungen Eubacteriales, Actinomycetales und Pseudomonadales nach fünfmonatiger Lagerung bei Temperaturen von +4°C, -15°C, -22°C und -76°C untersucht.

Die Mikroorganismen wurden in aliquoten Ansätzen mit physiologischer Kochsalzlösung oder mit Glycerin-(20 %)-Kochsalzlösung-(o,9 %) versetzt und als dichte Keimsuspensionen bei verschiedenen Temperaturen gelagert. Zum Gebrauch wurden aus diesen dichten Keimsuspensionen Verdünnungen hergestellt und deren biochemische Leistungen im Vergleich zu frischen Suspensionen geprüft. Die Untersuchung ergab, daß der Glycerinzusatz keinen wesentlichen konservierenden Effekt auf die enzymatischen Leistungen der Mikroorganismen hat. Bei Lagerungstemperaturen unterhalb von -22°C finden sich unvorhersehbare Ausfälle enzymatischer Leistungen, d.h. einzelner Hydrolasen. Eine Schädigung der Mikroorganismen macht sich bei einer Lagerungstemperatur von +4°C dadurch bemerkbar, daß zunächst Stoffwechselleistungen, die eine Koordination verschiedener enzymatischer Systeme verlangen, ausfallen. Hierzu gehören in erster Linie der Abbau der Kohlenydrate und Zuckeralkohole sowie der Aminosäuren z.B. Ornithin und Arginin und der Fettsäuren- wie Zitronensäure, Malonsäure und Ameisensäure.

Auf Grund der vorliegenden Untersuchungen ist anzunehmen, daß in dichten Suspensionen unterhalb von -22°C gelagerte und vermehrungsfähig gebliebene Mikroorganismen keine mit qualitativen Methoden nachweisbare Schädigung hydrolytisch

wirksamer Enzyme erfahren, wenn die Bakterienstämme in der spätexponentiellen Wachstumsphase geerntet, schnell eingefroren und sofort nach dem Auftauen geprüft werden.

Dieser Befund ist von praktischer Bedeutung, wenn z.B. diagnostische, biochemische oder taxonomische Untersuchungen mit Keimsuspensionen durchgeführt werden müssen, da es wegen der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeit der Mikroorganismen oder auch aus labortechnischen Gründen oft nicht möglich ist, verschiedene Bakterienstämme gleichzeitig zu ernten und zu verarbeiten.

Literatur:

1. ATKIN, L., MOSES, W., GRAY, P.:
The preservation of yeast culture by lyophilization
J. Bact. 57; 575-578 (1949)

2. BOURONCLE, B. A.
Preservation of living cells at -79°C with Dimethyl sulfoxyde
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 119; 958-961 (1965)

3. BÜRGER, H.
Ein Verfahren zur Prüfung zahlreicher Leistungen nicht-proliferierender Bakterien, dargestellt am Beispiel der Enterobacteriazeen
Zbl. Bakt. 1. Orig. 196; 469-476 (1965)

4. BÜRGER, H.
Biochemische Leistungen nichtproliferierender Mikro-organismen. II. Nachweis von Glycosid-Hydrolasen, Phosphatasen, Esterasen und Lipasen.
Zbl. Bakt. 1. Orig. 202; 97-109 (1967)

5. BÜRGER, H.
Biochemische Leistungen nichtproliferierender Mikro-organismen. III. Nachweis von Arylsulfatasen und Peptidasen
Zbl. Bakt. 1. Orig. 202; 395-401 (1967)

6. CLEMENT, M. T.
A simple method of maintaining stock cultures by low-temperatures storage.
Canad. J. Microbiol. 10; 613-615 (1964)

7. DOSEY, N. E.
Properties of ordinary water substance
Reinhold Publishing Corp., New York (1940)

8. DUBOS, R. J.
Mechanism of the lysis of pneumococci by freezing and thawing, bile and other agents
J. Exptl. Med. 66; 101-112 (1937)

9. FRY, R. M.
Freezing and drying of bacteria
Cryobiology 2; 665-693 (1966)

10. HAINES, R. B.
The effect of freezing on bacteria
Proc. Roy. Soc. (London), B. 124; 451-463 (1937-38)

11. HEGARTY, C. P., WEEKS, O. B.
Sensitivity of Escherichia coli to cold-shock during logarithmic growth-phase
J. Bact. 39; 475-484 (1940)

12. HILLIARD, C. H., DAVIS, M. A.
The germicidal action of freezing temperatures upon bacteria
J. Bact. 3; 423-431 (1918)

13. HOWARD, D. H.
The preservation of bacteria by freezing in Glycerol broth
J. Bact. 71; 625 (1956)

14. KEITH, S. C. jr.
Factors influencing the survival of bacteria at temperatures in the vicinity of the freezing point of water
Science 37; 877-879 (1913)

15. LEVITT, J., SCARTH, G. W.
Frost-hardening studies with plant cells. 1. Osmotic and bound water changes in relation to frost resistence and seasonal cycle. II. Permeability in relation to frost resistence and the seasonal cycle
Can. J. Research 14; 267-284, 285-305 (1936)

16. LEVITT, J.
Frost killing and hardiness of plants
Burgess Publishing Co., Mineapolis (1941)

17. MAJOR, C. P., McDOUGAL, J. D., HARRISON, A. P. jr.
The effect of the initial cell concentration upon survival of bacteria at -22°C
J. Bact. 69; 244-249 (1955)

18. MASORO, E. J.
Effect of cold of metabolic use of lipids
Physiol. Rev. 46; 67-101 (1966)

19. MAZUR, P.
Theoretical and experimental effect of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells
Cryobiology 2; 181-192 (1966)

20. MERYMAN, H. T.
Review of biological freezing
Cryobiology 2; 2-106 (1966)

21. MERYMAN, H. T.
Freeze-drying
Cryobiology 2; 610-660 (1966)

22. PARK, W. H.
Duration of life of Tryphoid Bacilli, derived from twenty different sources, in ice; effect of intense cold on bacteria
Science 13; 323 (1901)

23. PEDERSEN, T. A.
Factors affecting viable cells counts of freeze-dried crypticus terricolus cells
Anatomie Leeuwenhoek 31; 232-240 (1965)

24. POSTGATE, J. R., HUNTER, J. R.
On survivals of starved bacteria
J. Gen. Microbiol. 26; 367-378 (1961)

25. POSTGATE, J. R., HUNTER, J. R.
The survival of starved bacteria
J. Gen. Microbiol. 29; 233-263 (1962)

26. POSTGATE, J. R., HUNTER, J. R.
Accelerated death of Aerobacter aerogenes starved in the presence of growth-limiting substances
J. Gen. Microbiol. 34; 459-473 (1964)

27. POSTGATE, J. R., STRANGE, R. E.
Penetration of substances into cold-shocked bacteria
J. Gen. Microbiol. 36; 393-403 (1964)

28. PRUDDEN, T. M.
On the bacteria in ice, and their relation of disease, with special reference to the ice supply of New York city
Med. Record. 31; 341-350, 369-378 (1887)

29. ROYÉ, K.
Untersuchungen zur biochemischen Differenzierung nicht-proliferierender Bakterien aus den Ordnungen Pseudo-monadales, Eubacteriales und Aktinomycetales
Inaugural-Dissertation Marburg 1968

30. SEDGWICK, W. T., WINSLOW, C. E. A.
Experiments on the effect of freezing and other low temperatures upon the viability of the bacillus of tryphoid fever, with considerations regarding ice as a vehicle of infectous disease
Mem. Am. Acad. Arts. Sci. 12; 471-577 (1902)

31. STARKA, R. P., STOKES, J. L.
Metabolic injury to bacteria at low temperatures
J. Bact. 78; 181-185 (1959)

32. STRANGE, R. E., DARK, F. A.
Effect of chilling on Aerobacter aerogenes in aqueous suspension
J. Gen. Microbiol. 29; 719-730 (1962)

33. STRANGE, R. E., NESS, A. G.
Effect of chilling on bacteria in aqueous suspension
Nature 197; Nr. 4869 819 (1963)

34. TAPPEL, A. T.

Effect of low temperatures and freezing on enzymes and enzyme systems

Cryobiology 2; 163-176 (1966)

35. TOKYOKOWA, K., HOLLANDER, D. H.

Variation in sensitivity of E. coli to freezing damage during the growth-cycle

Biol. Med. 92; 499-500 (1956)

36. TURNER, T. B., BRAYTON, N. L.

Factors influencing the survival of Spirochetes in the frozen state

J. Exptl. Med. 70; 639-650 (1939)

37. TURNER, T. B.

The preservation of virulent Treponema pallidum and Treponema pertenue in the frozen state; with a note on the preservation of filtrable viruses

J. Exptl. Med. 67; 61-78 (1938)

38. WALKER, P. J.

Freeze preservation of Parasitic Protazoa

Lab. Pract. 15; 423-426 (1966)

39. WEISER, R. S., OSTERUD, C. M.

Studies of the death of bacteria at low temperatures

J. Bact. 50; 413-439 (1945)

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

in Marburg:
Bommer, Dölle, Gedigk, Hering, Heuser, Hennis, Korb, Lang, Mann, Marx, Niemeyer, Pantke, Rodeck, Salfeld, Schmid, Schleyer, Siegert, Streicher, Strohmeyer

in Berlin:
Clemens, Engel, Gauer, Günther, v. Herrath, Honerjäger, Jahr, Kirsten, Lautsch, Schütte, Schwarz, Selbach, Stein, Ullrich, Wiemer

in Erlangen:
Bock, Gräf, Hornstein, Kröncke, Paschke, Schüle, Steinhardt, Weiß.

Herrn Prof. Dr. med. R. SIEGERT, Direktor des Hygieneinstitutes der Universität Marburg an der Lahn, danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die uneingeschränkte Förderung meiner Arbeit.

Ferner bin ich Herrn Dipl. Chemiker Dr. med. H. BÜRGER für seine Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und Herrn Privatdozent Dr. med. W. MANNHEIM für die Überlassung der Bakterienstämme und freundliche Beratung zu herzlichem Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 3. März 1941 wurde ich als Tochter des Arztes Dr.med. Richard Hinze und seiner Ehefrau Liselotte Hinze, geb. Depenau, in Berlin geboren.

1947 wurde ich in Berlin eingeschult, zog 1948 mit meinem Vater und meinen Geschwistern nach Rathenow/Havel (SBZ). Dort legte ich 1960 die Reifeprüfung ab und mußte, bevor ich mein Studium beginnen konnte, das sog. "Praktische Jahr" ableisten. Hierfür arbeitete ich im Kreiskrankenhaus Rathenow und in der Zahnklinik für Kieferorthopädie.

1961 begann ich mein Studium der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde in Halle/Saale.

Im Dezember 1961 gelang meiner Familie und mir die Flucht nach Berlin-West. Hier nahm ich am Vorstudienkurs teil und erhielt 1962 die Anerkennung meines in der SBZ erworbenen Reifezeugnisses.

Zum WS 1962/63 immatrikulierte ich mich an der Freien Universität Berlin und begann erneut das Studium für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten. 1965 bestand ich hier das Physikum.

Zum WS 1965/66 begann ich das klinische Studium in Marburg an der Lahn.

Zum SS 1967 wechselte ich nach Erlangen und bestand hier am 28. Juni 1968 das Staatsexamen.

Durch meine Heirat habe ich meine zahnärztliche Tätigkeit noch nicht aufnehmen können, beginne aber im Februar 1970 als Assistentin in Norden/Ostfriesland.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990